

AP20 Res'd PCT/PTO 03 FEB 2006

Con la Melagenina Plus el tratamiento consiste en la aplicación tópica del producto 1 vez al día y sin exposición a la luz solar. Su principio activo es una alfa lipoproteína obtenida a partir de los cotiledones placentarios humanos, mediante el procesamiento de éstos con solventes orgánicos y su posterior redisolución en una solución de etanol con cloruro de calcio.

La L-Prolina no es un aminoácido tipo ya que su estructura se considera un iminoácido, pues su grupo NH lo tiene comprometido con carbonos adyacentes. Por lo tanto se considera un  $\alpha$ -iminoácido de peso molecular igual a 115.1.

Hasta la fecha no existe ningún reporte en el estado de arte que vincule el uso de la Prolina para incrementar la producción de melanocitos, ni para provocar la repigmentación de la piel de pacientes aquejados de vitíligo.

#### Descripción de la Invención

La composición objeto de la presente invención tiene como principio activo el aminoácido L-Prolina, el cual estimula la síntesis del pigmento melánico de la piel y la reproducción de melanocitos, careciendo de reacciones secundarias severas según se demuestra en los ensayos toxicológicos y clínicos realizados.

Mediante la presente invención sorprendentemente se ha demostrado que la L-Prolina posee un efecto cualitativamente superior en el proceso de melanogénesis, comparado con los productos ya existentes en el estado del arte citados anteriormente.

Dicho producto estimula la síntesis del pigmento melánico de la piel y la reproducción de los melanocitos como demuestran los ensayos farmacológicos a que fue sometido, careciendo totalmente de reacciones secundarias severas como demuestran los ensayos toxicológicos, teratológicos y clínicos realizados. Es de fácil obtención y aplicación, y el efecto repigmentante comienza rápidamente (15 a 20 días) después de iniciar el tratamiento, siendo irreversible al descontinuar la aplicación del producto. El color adquirido por la piel donde se aplica es idéntico al de las áreas de la piel normal del paciente, las cuales a su vez no incrementan la intensidad de su coloración posteriormente.

De acuerdo a los ensayos clínicos realizados con la composición de la invención, la L-Prolina ha demostrado exitosos resultados, para el tratamiento del vitíligo y su uso ha alcanzado una efectividad notable en todos los pacientes donde se ha aplicado. Es un producto que se aplica satisfactoriamente por vía tópica tan solo 3 veces por semana, algo que nunca había sido logrado hasta el momento en el tratamiento de esta afección.

El proceso para la obtención de la composición objeto de invención se llevó a cabo utilizando una solución de L-Prolina (Sigma), calidad reactivo, en un rango de concentración de 0.5-2 mg/ml, para lo cual se utilizó etanol de entre 70°-90°, manteniéndola almacenada a una temperatura entre 22-28°C, en frascos de vidrio color ámbar de 120 ml.

### EJEMPLO 1

En el ensayo biológico se determinó la actividad melanogénica de la solución hidroalcohólica de 80° y L-Prolina 1.5 mg/ml, en comparación con la Melagenina Plus sobre los melanocitos de la capa basal de la epidermis de las orejas de ratones negros machos de 18-22 g de peso de la cepa C57BL6 suministrados por CENPALAB.

El ensayo de cada producto fue repetido en tres ocasiones.

El análisis histoquímico en la epidermis de las orejas de dichos ratones hizo evidente los cambios producidos en los conteos de melanocitos presentes en dicho tejido (Nordlund et al, 1981).

Para la ejecución de estos ensayos se seleccionaron grupos de ratones integrados por 5 animales cada uno. Las muestras ensayadas fueron las siguientes:

- A- Control- Alcohol 80°
- B- Melagenina Plus
- C- Solución hidroalcohólica de L-Prolina

El estudio se realizó mediante la aplicación tópica durante un periodo de cinco días consecutivos en una ocasión diaria, sobre la oreja de ratones.

El peso promedio de los animales fue de 20.15 g y los mismos permanecieron por espacio de 10 días aclimatándose a las condiciones del Bioterio. Concluidas las 5 aplicaciones y a las 72 horas de la última se procedió al sacrificio de los animales, por tracción de las vértebras cervicales.

Una vez sacrificados los animales se depilaron ambas orejas, utilizando para ello una crema depilatoria, la misma se retira 10 minutos después de ser aplicada y se lavan las orejas con abundante agua corriente.

Con el fin de obtener la epidermis de cada oreja y someterlas al método histoquímico de incubación en L-Dopa el primer paso consiste en separar la piel del cartílago, lo que se hace por métodos manuales. A continuación la piel de cada oreja se introduce en

una solución 1M de Cloruro de Calcio a temperatura ambiente durante una o dos horas facilitando con esto la separación dermis – epidermis. Una vez logrado esto la epidermis es lavada en agua destilada durante 10 minutos y se inicia el proceso:

Se coloca la epidermis durante 20 minutos en alcohol 85°

5 Se lava en agua destilada

Se somete durante 1 hora a la solución de L-Dopa (1mg/ml) disuelta en buffer fosfato a 37°C

Esta solución es renovada y permanecen en la misma por espacio de 12-15 horas

Se lavan entonces con abundante agua corriente, con el fin de eliminar del tejido el  
10 exceso de Dopa.

Se lava nuevamente en agua destilada

Se fijan durante 20 minutos en Formol Neutro al 10%

Se lavan nuevamente en agua destilada

Son finalmente montadas en solución de montaje semipermanente

15 Para determinar el número de melanocitos por milímetro cuadrado se seleccionan cinco áreas diferentes de cada oreja, escogiendo las zonas en que se observa una mayor cantidad de los mismos y utilizando la parte del programa DIGIPAT específico para conteo de células, se determinó la cantidad de melanocitos por milímetro cuadrado en cada una de estas, de manera que se obtienen 10 valores por animal y por lo tanto 50  
20 valores para cada grupo.

Se realizaron ensayos para determinar la Acción melanogénica de la L-Prolina en comparación con la Melagenina Plus. Como se puede observar en la Figura 1 se ha demostrado que la L-Prolina posee un notable efecto melanogénico superior, en los melanocitos de la oreja de ratones negros sobre la Melagenina Plus.

25 Los resultados experimentales obtenidos demuestran que el aminoácido L-Prolina estimula la reproducción de los melanocitos y la síntesis del pigmento melánico de la piel cuando se aplica en solución hidroalcohólica por vía tópica, obteniéndose un valor cuantitativamente superior al compararlo con la Melagenina Plus y el Control (Alcohol 80°).

30

## EJEMPLO 2

Para realizar los ensayos clínicos en humanos se seleccionaron 21 pacientes de vitiligo bajo el principio de voluntariedad, pertenecientes al servicio clínico nacional del centro, que quedaron distribuidos de la manera siguiente:

35

**Sexo**

10 pertenecientes al sexo Femenino

11 pertenecientes al sexo Masculino

**Raza**

5 16 pertenecientes a la raza Blanca

4 pertenecientes a la raza Negra

1 perteneciente a la raza Mestiza

**Edad**

4 menores de 15 años

10 17 mayores de 15 años

**% de despigmentación**

14 menos del 10 %

3 entre el 10 y 20 %

4 entre el 20 y 40 %

15 Es importante señalar que todos los pacientes seleccionados habían sido resistentes al tratamiento con la Melagenina Plus durante un tiempo mínimo de un año.

El tratamiento consistía en aplicarse una solución hidroalcohólica al 80 % de L-Prolina en concentración de 1.5 mg/ml, frotándola con los dedos sobre las áreas de la piel despigmentada por la enfermedad, 3 veces por semana (Lunes, miércoles y viernes).

20 La inocuidad del producto a utilizar en el ensayo fue demostrada mediante las correspondientes pruebas de irritabilidad dérmica y oftálmica.

A cada paciente se le realizó una historia clínica en relación con su enfermedad al inicio de la experiencia y se le tomaron fotografías digitales de las áreas de despigmentación en las que se indicó aplicar la solución hidroalcohólica de L-Prolina.

25 Para comprobar los efectos del tratamiento se citaron los pacientes al mes, a los 3 meses y a los 6 meses de haber comenzado el uso del producto a estudiar.

En cada reconsulta se determinó el efecto repigmentante obtenido, el cual fue evaluado de la forma siguiente:

**Notable:**

30 Disminución del % de despigmentación corporal.

Aparición de pigmento en forma de pecas dentro o en los bordes de la lesión.

Disminución del tamaño de la lesión

**Moderada:**

Opacificación del color de la lesión sin la desaparición, ni disminución de esta.

Mala:

Ningún cambio.

Finalmente, se repitió la toma de fotografía digital en la zona tratada de aquellos casos  
5 en los cuales se vieron cambios apreciables en la repigmentación.

La duración total del ensayo fue de 6 meses.

Resultados del ensayo clínico

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla, así como en las fotografías  
(Figuras 2- 13).

10

Tabla # 1. Resultados de la Repigmentación

No.	Repigmentac. Total	Repigmentac. Parcial	Sin Repigmentac.	Incremento Lesiones	Evaluación del efecto
1.-	-	X	-	-	Notable *
2.-	-	X	-	-	Notable
3.-	-	X	-	-	Notable
4.-	-	X	-	-	Notable
5.-	-	X	-	-	Notable *
6.-	-	X	-	-	Notable *
7.-	-	X	-	-	Notable
8.-	-	X	-	-	Notable
9.-	-	X	-	-	Notable *
10.-	-	X	-	-	Notable *
11.-	-	X	-	-	Moderada
12.-	-	X	-	-	Moderada
13.-	-	X	-	-	Moderada
14.-	-	X	-	-	Moderada
15.-	-	X	-	-	Moderada
16.-	-	X	-	-	Moderada
17.-	-	X	-	-	Moderada
18.-	-	X	-	-	Moderada
19.-	-	-	X	-	Mala
20.-	-	-	X	-	Mala
21.-	ABANDONO				

Como se puede observar en la tabla anterior, de un total de 21 pacientes, solo 2 no respondieron al tratamiento y 18 de ellos tuvieron una respuesta de notable a moderada, solo un paciente abandonó el tratamiento, por lo cual no se pudieron valorar sus resultados. Por otra parte es de notar que en ninguno de los casos hubo un  
 5 incremento de las lesiones, ni se observaron reacciones secundarias locales o sistémicas.

Los resultados obtenidos demostraron la efectividad terapéutica, así como la inocuidad de la L-Prolina en solución hidroalcohólica. El hecho de que la mayoría de los pacientes respondieran positivamente utilizando solamente 3 veces por semana indica su  
 10 superioridad frente a la Melagenina Plus, aún más si se considera que todos ellos habían sido refractarios a dicho producto usándolo diariamente.

Otra ventaja que ofrece este compuesto con relación a la Melagenina Plus está dada porque es de origen sintético, evitándose las engorrosas y costosas pruebas que se le realizan a las placentas que son utilizadas en el proceso de obtención de la Melagenina  
 15 Plus, con el fin de evitar la contaminación de las mismas.

### EJEMPLO 3.

Para llevar a cabo los estudios de estabilidad se realizaron determinaciones espectrofotométricas y de análisis de aminoácidos de la solución hidroalcohólica  
 20 L-Prolina, recién preparada (fresca) y a los 12 y 24 meses después de haber sido elaborada. Se demostró según las técnicas anteriores que la L-Prolina es estable hasta dos años después de preparada la solución. (Tabla # 2 y 3).

Tabla # 2 Resultados del estudio de estabilidad por espectrofotometría

<b>Producto</b>	<b>Determinación de espectro</b>			
	<b>(nm)</b>	<b>Fresco</b>	<b>12 meses</b>	<b>24 meses</b>
L-Prolina	200-205	0,051 UA	0,072 UA	0,071 UA

25

Tabla # 3 Resultados del estudio de estabilidad por análisis de aminoácidos

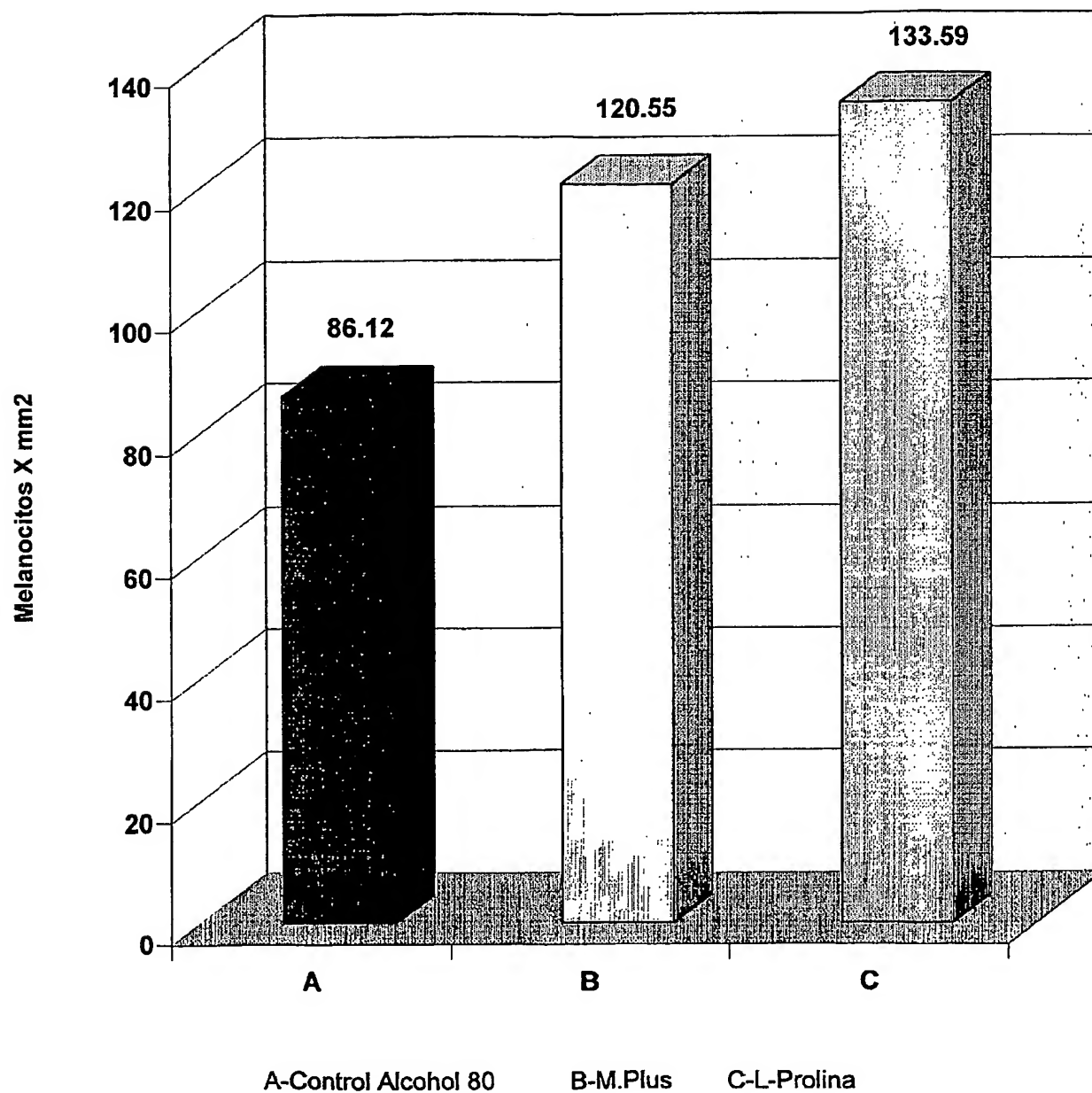
<b>Producto</b>	<b>Determinación de aminoácidos</b>		
	<b>Fresco</b>	<b>12 meses</b>	<b>24 meses</b>
L-Prolina	1,01 mg/ml	1,00 mg/ml	1,00 mg/ml

## REIVINDICACIONES

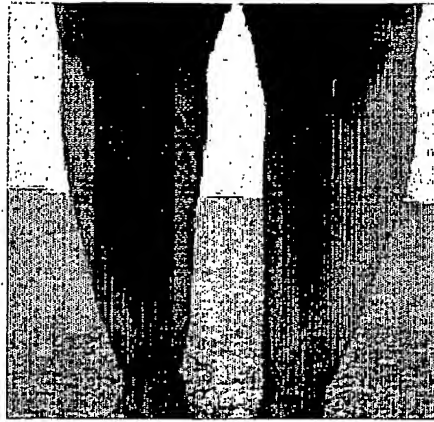
### COMPOSICIÓN PARA EL TRATAMIENTO DEL VITILIGO.

- 5 1.- Composición para el tratamiento de vitiligo caracterizada porque contiene como principio activo L-Prolina en un vehículo alcoholico.
- 2.- Composición según la reivindicación 1 caracterizada porque la L-Prolina se encuentra en una proporción de 0.5-2 mg/ml de excipiente alcoholico.
- 3.- Composición según la reivindicación 1 caracterizada porque el vehículo alcoholico  
10 es etanol entre 70° y 90°.
- 4.- Uso de la L-Prolina para el tratamiento del vitiligo.
- 5.- Método de tratamiento del vitiligo caracterizado porque una composición que comprende L-Prolina en un excipiente alcoholico se aplica tópicamente a los pacientes mediante la frotación con los dedos en las áreas afectadas, 3 veces por semana.

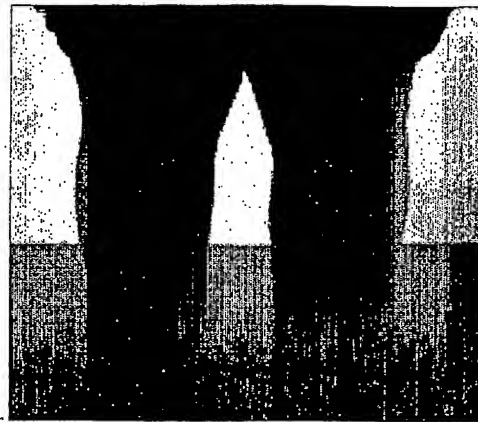
**Figura I**  
**Acción Melanogénica**  
**Epidermis. Oreja de Ratón negro**







**Antes**  
**Figura 2**



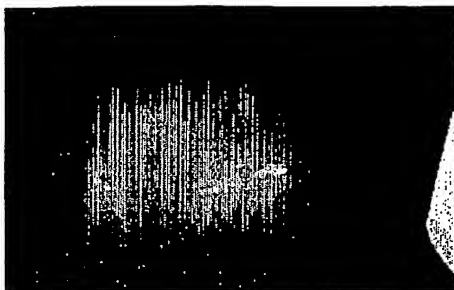
**Después**  
**Figura 3**



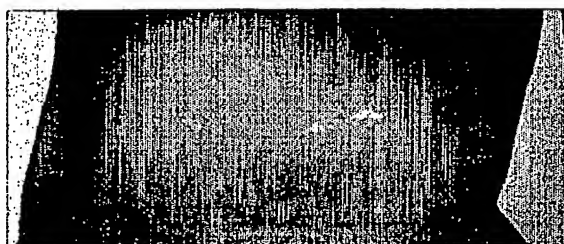
**Antes**  
**Figura 4**



**Después**  
**Figura 5**



Antes  
Figura 6

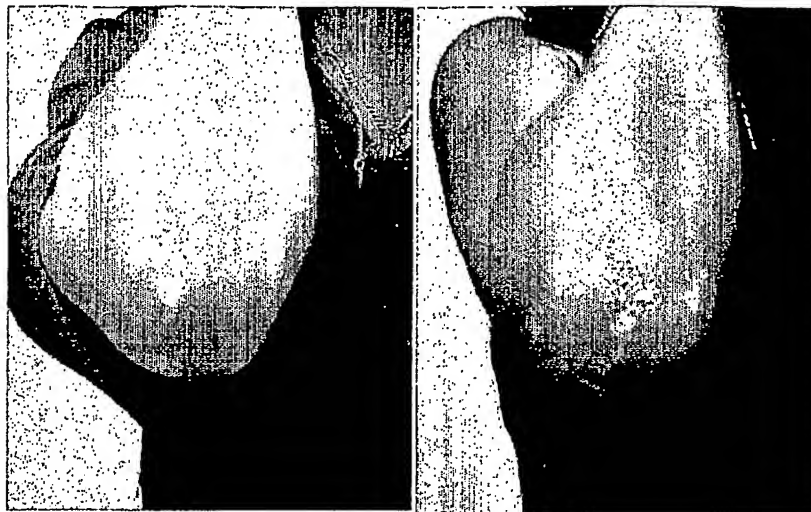


Después  
Figura 7



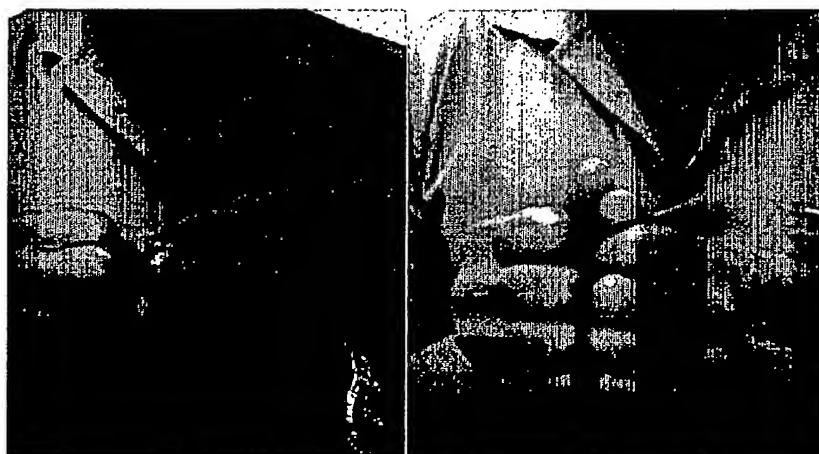
Antes  
Figura 8

Después  
Figura 9



**Antes**  
**Figura 10**

**Después**  
**Figura 11**



**Antes**  
**Figura 12**

**Después**  
**Figura 13**

**BEST AVAILABLE COPY**